

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 10-194975

(43)Date of publication of application : 28.07.1998

(51)Int.Cl.

A61K 31/70

A61K 31/70

(21)Application number : 09-014466

(71)Applicant : MORINAGA MILK IND CO LTD
NIPPON BEET SUGAR MFG CO LTD

(22)Date of filing : 10.01.1997

(72)Inventor : TOMITA MAMORU
HAYASAWA HIROKI
OHASHI TOSHIO
KAWASE KOZO
NAKAMURA HIROHIKO
SAYAMA KOJI

(54) HEPATIC DISEASE MEDICINE

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain the subject medicine capable of improving the syndromes of a hepatic disease patient, especially hyperammonemia, and little in side effects by including highly pure raffinose as an active ingredient. SOLUTION: This hepatic disease medicine contains highly pure raffinose as an active ingredient. The raffinose is preferably administered at a daily dose of 0.3-0.9g per kg of a body. The raffinose is produced e.g. from beet roots by a known method. The medicine may further contain a known vehicle, a known shape-retaining agent, a known filler, etc.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

08.10.2002

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平10-194975

(43) 公開日 平成10年(1998) 7 月28日

(51) Int.Cl.⁶

A 6 1 K 31/70

識別記号

A C S

A B Y

F I

A 6 1 K 31/70

A C S

A B Y

審査請求 未請求 請求項の数 2 F D (全 9 頁)

(21) 出願番号

特願平9-14466

(22) 出願日

平成 9 年(1997) 1 月10日

(71) 出願人 000006127

森永乳業株式会社

東京都港区芝 5 丁目33番 1 号

(71) 出願人 000231981

日本甜菜製糖株式会社

東京都中央区京橋 2 丁目 3 番13号

(72) 発明者 富田 守

神奈川県座間市東原 5 - 1 - 83 森永乳業
株式会社食品総合研究所内

(72) 発明者 早瀬 宏紀

神奈川県座間市東原 5 - 1 - 83 森永乳業
株式会社栄養科学研究所内

(74) 代理人 工藤 力

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 肝疾患治療剤

(57) 【要約】

【課題】 肝疾患患者の症状、特に高アンモニア血症の改善を行うことが可能であり、副作用の少ない肝疾患治療剤を提供する。

【解決手段】 高純度ラフィノースを有効成分として含有する肝疾患治療剤。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 高純度ラフィノースを有効成分として含有する肝疾患治療剤。

【請求項2】 該ラフィノースが、1日体重1kg当たり0.3～0.9gの割合で投与される請求項1に記載の肝疾患治療剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、高純度ラフィノースを有効成分として含有する肝疾患治療剤であり、主として肝疾患に伴う高アンモニア血症の改善を目的として投与される薬剤に関する。

【0002】

【従来の技術】肝臓は門脈を介して消化管からの血流を集めており、肝血流の3/4は門脈血流が占めている。肝臓は種々の重要な機能を果たしているが、特に消化管と関連する主要な機能として、消化管から吸収された栄養素を肝臓が保持し、生体に必要な物質に代謝する機能があげられる。また、消化管から吸収された不必要な物質及び有害な物質は、肝細胞に摂取された後、親水性物質に代謝され、胆道系又は腎臓から体外に排泄される。更に、肝臓はアンモニアを尿素回路で処理し、尿素とする等の解毒機能も有している。

【0003】肝硬変は全ての肝疾患の終末像であり、肝細胞機能障害とともに門脈血流の異常が起こり、特に肝硬変の非代償期では消化管起源の中毒性物質（アンモニア、低級脂肪酸、メルカプタン、インドール化合物等）の解毒機能は著しく阻害され、これに基づいて肝性脳症等の諸症状が発症する。

【0004】一方、腸内菌叢は食事の消化吸収に関与するとともに、種々の有害物質の生成及び吸収に関与しており、肝臓の役割と腸内菌叢との関連は極めて大きいことが知られている（社団法人日本ビフィズス菌センター編、「腸内菌叢と代謝」、第38～56ページ、第7回研修テキスト、1991年）。

【0005】例えば、肝疾患患者と健常者との腸内菌叢の比較実験から、肝硬変患者では健常者に比較して糞便中の嫌気性菌数が著増し、その主な菌種はバクテロイデスであることが知られている（日本消化器病学会誌、第77巻、第10号、第28～36ページ、1980年）。また、嫌気性菌の中には腸管内のアンモニア産生に関与するウレアーゼ活性を有する細菌が多く、前記バクテロイデスはその主要菌として知られている（消化器臨床生理、第5巻、第71～90ページ、1981年）。

【0006】これらの知見に対して、重症肝疾患の治療の目的のため古くから種々の方法が試みられ、非代償性肝硬変に認められる肝性脳症に対する治療法は著しく進歩し、肝機能の改善をも期待できるようになった。例えば、非代償性肝硬変を主とした肝不全に対する高分岐鎖

アミノ酸製剤の投与等が知られている（渡辺明治及び沖田美佐子著、「肝臓病と治療栄養」、第一出版、1992年）。更に、腸内菌叢改善を意図して、肝性脳症、高アンモニア血症の治療にラクチュロース製剤が広く用いられている（日本医薬品情報センター編、「日本医薬品集」、業業時報社、1996年）。

【0007】以上のとおり、従来、肝疾患と腸内細菌叢との関連及び肝疾患の治療における症状改善を目的とした薬剤等が知られているが、ラクチュロースはビフィズス菌に幅広く資化性を有する非消化性のオリゴ糖であり、同様のオリゴ糖として各種ガラクトオリゴ糖、各種フラクトオリゴ糖、ラフィノース等が知られている。これらのオリゴ糖は、ビフィズス菌増殖因子として腸内環境の改善、便性の改善、腸内腐敗産物の産生抑制等の効果を有し、主として食品分野で幅広く利用されている（月刊フードケミカル、第10巻、第79～84ページ、1986年）。

【0008】しかしながら、従来これらのオリゴ糖のうち肝疾患の治療に用いられている薬剤は、肝性脳症及び高アンモニア血症改善用のラクチュロース及びラクチトールのみであった（日本臨床、第52巻、第1号、第110～118ページ、1994年）。

【0009】ラクチュロースは広範なビフィズス菌種に対する資化性を有し、ビフィズス菌を増殖させるとともに、代謝されて有機酸となり腸管内のpHを低下させ、腐敗菌により産生されるアンモニアの腸管からの吸収を阻害し、腸管の蠕動運動を促進して腸管内容物の腸管内滞留時間を短縮し、排便を促進することが知られている（日本臨床、第46巻増刊、第1077～1083ページ、1988年）。これらの作用により、アンモニアをはじめとする各種毒性物質の腸管からの吸収を抑制するとともに、最近では腸管によるアンモニア産生を抑制するという報告もなされている〔ヘパトロジー（Hepatology）、第6巻、第1133ページ、1986年〕。

【0010】しかしながら、ラクチュロースは、大腸菌、クロストリジウム菌等にも資化され、ビフィズス菌等の有用菌の選択利用性にやや難点を示す場合がある。また、投与量によっては下痢の誘発、腹部膨満感を惹起しやすい。更に、ラクチュロースは、甘味が強く、人によっては多量の摂取を行なうことが困難な場合がある等の難点があった。

【0011】一方、ラクチトールは糖アルコールに属する物質であるが、その性質はオリゴ糖の性質に類似し、ラクチュロースと同様に肝性脳症、高アンモニア血症の治療にも用いられている（臨床医薬、第11巻、第7号、第1439～1473ページ、1995年）。しかしながら、ラクチトールは、ヒト由来の各種ビフィズス菌に対する資化性がそれ程広くないという欠点があり（ビフィズス、第9巻、第1号、第19～26ページ、1995年）、腸内菌叢の改善が不充分となり、患者に

よっては効果が得られない場合がある。

【0012】このように、従来公知の肝疾患治療剤として知られているラクチュロース、ラクチオールには、肝疾患の症状の改善を目的とした腸内環境改善作用等において未だ改良の余地があり、特に実用上の点から更に望ましい肝疾患治療剤の開発が期待されていた。

【0013】次に、従来公知の前記肝疾患治療剤以外に、近年腸内環境改善の面から研究されている糖類としてラフィノースがある。ラフィノースは、ラクチュロース程の広いビフィズス菌資化性は有していないが、腐敗菌、アンモニア産生菌には資化され難く、ビフィズス菌の生育に対する選択的糖源として優れたオリゴ糖であることが知られており、腸内腐敗産物の生成抑制、便性改善効果についても明らかにされている〔ビフィドバクテリア・アンド・マイクロフローラ(Bifidobacteria and Microflora)、第6巻、第2号、第34～40ページ、1993年〕。

【0014】しかしながら、従来ラフィノースの利用は、加工特性を利用した食品、吸湿性を利用した可食性脱水剤、移植臓器の輸送液の安定剤、生菌剤の安定化等への用途が主流であった(ジャパンフードサイエンス、第9号、第34～40ページ、1993年)。

【0015】その他に、腸内環境改善用組成物として、ラフィノース、スタキオース等のガラクトオリゴ糖と食物繊維を併用した組成物が、肝性脳症、大腸癌の治療及び予防に効果のあることが知られている(特開平3-151854号公報)が、該組成物の効果は腸内腐敗産物量の減少に止まり、肝疾患に対する効果は明確でなく、本格的に肝疾患用の医薬品として用いることを意図されたものではなかった。また、該公報には、オリゴ糖のみを投与しても、腸内菌叢改善効果が見い出せないことが明記されている。また、ラフィノースをはじめとする難消化性オリゴ糖とポリデキストロースを含有する流動性食品が、便通改善作用を有することも知られていた(特開昭62-220169号公報)が、該流動性食品も便通への効果に止まったものであった。更に、ラフィノースを含むオリゴ糖と可食性食物繊維との糖類混合物を主成分とする食品が、整腸作用を有し、健康増進に効果のあることが知られていた(特開昭63-63366号公報)が、該食品も肝臓疾患に対する効果については全く知られていなかった。

【0016】以上の他にも、公知の各種オリゴ糖が、腸内環境を改善し、腐敗菌による有害物質の生成を抑制することにより、身体の健康に寄与する研究は多数知られているが(ビフィズス、第7巻、第1号、第1～12ページ、1993年)、腸管以外の臓器の機能に与える影響について、前記ラクチュロース、ラクチオール以外のオリゴ糖の研究は行なわれておらず、明確な評価もなされていなかった。

【0017】ラットを用いて、ガラクトサミン肝障害の

発症に及ぼす飼料中の各種オリゴ糖の影響について検討を行い、ガラクトースを含むラクチュロース、ラフィノース、2種のガラクトオリゴ糖、ガラクトース、ラクトース及びガラクトサミンによる肝障害の発症抑制効果が報告されているが(日本栄養食糧学会誌、第48巻、第3号、第181～187ページ、1995年)、この実験結果は、ラットに特異的に起こるガラクトサミン肝障害の発症抑制にオリゴ糖、又は単糖としてガラクトースが深く関与していることを明らかにしたのみであり、ヒトの高アンモニア血症改善効果についてのオリゴ糖の効果は何ら示唆していない。

【0018】本発明者らは、ラフィノースが腸内環境を改善することを見出し、ラフィノースを含有する肝疾患患者用食品組成物を発明し、既に特許出願した(平成8年12月26日出願。整理番号P000010829。以下先願と記載する。)。しかしながら、先願の発明は、医薬品による治療を受けている肝疾患患者が摂取する食品等に係るものであり、医薬品による治療を側面から援助するものである。更に、先願の発明においては、ラフィノースは溶解度が低いこと、食品の他の成分とのバランスの関係等から、肝疾患を直接的に治療するために有効な量を投与し得ないという難点があった。

【0019】以上のとおり、従来公知の肝疾患治療剤には、真に腸内環境改善を主体とした、肝疾患の症状改善効果を発現する薬剤はなく、肝疾患の症状改善、特に高アンモニア血症の改善に使用されるオリゴ糖として、副作用が少なく、効果的な、また、飲用、摂取しやすいオリゴ糖を主成分とする薬剤が待望されていた。

【0020】

【発明が解決しようとする課題】本発明者らは、前記従来技術に鑑みて、先願出願後先願よりも多量のラフィノースの投与が肝疾患患者の肝機能に及ぼす効果について詳細な研究を行った。その結果、高純度ラフィノースを有効成分として含有する薬剤が、肝疾患患者の症状改善、特に高アンモニア血症の改善に有効であること、及び高純度ラフィノースを有効成分として含有する薬剤は、肝疾患患者の腸内環境を顕著に改善し、かつ副作用の心配が少ないことを見出し、本発明を完成した。

【0021】本発明の目的は、肝疾患患者の症状、特に高アンモニア血症の改善を行うことが可能であり、副作用の少ない肝疾患治療剤を提供することにある。

【0022】

【課題を解決するための手段】前記の課題を解決する本発明は、高純度ラフィノースを有効成分として含有する肝疾患治療剤であり、ラフィノースが、1日体重1kg当たり0.3～0.9gの割合で投与されることを望ましい態様としてもいる。

【0023】次に本発明について詳細に説明する。

【0024】

【発明の実施の形態】本発明に使用するラフィノースと

しては、市販品であってもよく、公知の方法（例えば、特開昭54-49345号公報記載の方法等）により甜菜根から製造されたラフィノース、大豆ホエーから公知の方法（例えば、特開昭59-179064号公報記載の方法等）により製造したラフィノースであってもよい。また、大豆オリゴ糖として製造されるオリゴ糖混合物から、クロマトグラフィー等の公知の方法により、ラフィノース含量を増加させたもの、又は純粋に分離したものを利用することもできるが、可及的に高純度のものを使用するのが望ましい。

【0025】また、本発明の肝疾患治療剤は、前記ラフィノース粉末そのものでも良いが、必須成分であるラフィノースの他に、保存性を高めるため、剤形を整えるため等の目的から、公知の賦形剤、保形剤、増量剤、乳化剤、香料、着色料、防腐剤等を添加し、常法により液状、粉末状、顆粒状等に加工することができる。

【0026】また、これらのラフィノースの肝疾患患者への有効投与量は、患者の症状、年齢等により異なるが、後記する試験例から明らかとなっており、1日体重1kg当り0.3～0.9gの範囲で投与することが望ましい。

【0027】本発明の肝疾患治療剤を、公知の肝疾患治療剤と併用することもできる。肝疾患に対する公知の薬剤として、例えば、各種アミノ酸、各種必須脂肪酸、ラクチュロース、ラクチトール及びその他の各種オリゴ糖、ビタミン類（例えばビタミンA、D、K等）、ミネラル類（例えば亜鉛製剤等）、を例示することができる。特にラクチュロースと併用する場合は、ラフィノース1部（重量。以下特に断りのない限り同じ）に対してラクチュロース1/6～2部の割合が最も望ましい。尚、ラフィノースは甘味度がショ糖の約1/10以下であり、飲用、摂取が容易であるという利点も有している。

【0028】以上のようにして製造された本発明の肝疾患治療剤は、後記のとおり肝疾患の諸症状、特に高アンモニア血症、の改善に有効である。

【0029】次に試験例を示して本発明を詳細に説明する。従来、肝疾患治療剤の主成分であるオリゴ糖を開発するために行なわれてきた試験の問題点は、肝疾患患者の腸内環境を十分に把握、反映して行われておらず、前記のとおり、従来のオリゴ糖製剤による肝疾患の諸症状の改善効果は、この点において不充分であった。

【0030】本発明者らは、前記のとおり嫌気性のアンモニア産生菌が、腸内に多く存在し、腸内環境の悪化した肝疾患患者の腸管内を想定して製剤中のオリゴ糖を選定する場合、

①腸内の主要な構成ビフィズス菌に幅広く資化性があり、かつ生育速度が速く、添加したオリゴ糖が他の腐敗菌等に利用されることが少ないこと。

②添加されたオリゴ糖が、ビフィズス菌等の有用菌に十

二分に利用された結果として、腸管内の酸生成量が高いこと。

③添加されたオリゴ糖が、ビフィズス菌等の有用菌に十二分に利用された結果として、腸管内のpH値が可能な限り低下していること。

が、悪化した腸内環境を迅速に改善し、肝疾患の諸症状の改善効果を高めるために重要な要素であると考えた。

【0031】前記①～③の条件が満たされた場合、腸管内の腐敗菌等によるアンモニア、インドール、スカトール等の毒性物質の産生も早期に、確実に、かつ効果的に抑制することが可能であり、肝機能負担の軽減により、肝疾患の諸症状の確実な改善効果を具現するものと考えられる。従って、本発明者らは、これら3点に可能な限り近い条件での予備試験を実施した。

【0032】実験方法としては、肝疾患患者に最も適合した条件下で所望のオリゴ糖製剤を的確に試験するために、各種オリゴ糖による腸内の主要ビフィズス混合菌の資化性と増殖速度、酸生成、pH値の各指標を総合的に評価する方法を採用した。

予備試験

この試験は、ヒトの腸管内に高頻度に検出されるビフィズス各菌の混合培養の系に対し、添加されたオリゴ糖の増殖促進効果を判定することにより、肝疾患患者の症状改善を図るために投与する製剤中のオリゴ糖を選別するために行った。尚、この試験は、使用する菌株を変更したことを除き、前記先願の予備試験1と同一の方法により実施したが、その試験方法の概略は次のとおりである。

【0033】我国の成人、老人に検出される頻度の高いビフィズス菌株として、ビフィドバクテリウム・アドレッセンティス（*Bifidobacterium adolescentis*）ATCC15703、ビフィドバクテリウム・ビフィダム（*Bifidobacterium bifidum*）ATCC29521、ビフィドバクテリウム・ロンガム（*Bifidobacterium longum*）ATCC15707の3種の菌株を選択し、腸内菌叢を想定してこれら3菌種の混合系を用いた。

【0034】試験方法における基礎培地〔酵母エキス0.5%（重量。以下特に断りのない限り同じ）、肉エキス0.5%、グルコース2%、リン酸一カリウム0.1%、リン酸二カリウム0.1%、無水酢酸ナトリウム0.2%、シスチン0.05%、ツィーン80（Tween 80）0.05%、精製水（イオン交換水）96.5%からなる〕、この基礎培地により前記3菌種の混合系を培養した前培養液及び基礎培地に添加するグルコースの代りに表1に示す各種オリゴ糖を2%添加した試験培地を調製した。この試験培地により前記3菌種の混合系を培養し、試験を行った。

【0035】試験培地におけるビフィズス菌混合培養の系に対して、各種オリゴ糖類の効果を総合的に評価するため、増殖速度、培地の酸度及び培地pHの3点から、

10

20

30

40

50

次式により生育活性値を算出し、評価検討を行った。

【0036】生育活性値＝（培地の濁度増加）×（培地の酸度）／（培地のpH）

この式において「培地の濁度増加」は、主要ビフィズス菌の速やかな増殖の程度を、「培地の酸度」は添加オリゴ糖に対する酸生成力を、「培地のpH」は添加オリゴ糖の利用によるpH低下力を、それぞれ意味するものであり、生育活性値は、前記の式によってこれら3要因の影響を総合的に判断するためにまとめたものである。

【0037】この試験結果は表1に示すとおりである。

表1から、ラフィノースが最も生育活性値が高く、ラクチュロースがそれに続き、ラクチトール、ガラクトオリゴ糖の生育活性値は低いことが判明した。

【0038】また、その他の公知のオリゴ糖であるフラクトオリゴ糖、キシロオリゴ糖、ラクトスクロース、イソマルトオリゴ糖等のいずれのオリゴ糖でも、その値、効果ともにラフィノース及びラクチュロースに及ばなかった。

【0039】

【表1】

試験培地に添加したオリゴ糖	各測定結果			生育活性値
	濁度増加	酸度	pH	
ラクチュロース	0.98	11.8	3.8	3.0
ラフィノース	1.07	13.5	3.6	4.0
ラクチトール	0.78	7.0	4.2	1.3
ガラクトオリゴ糖	0.84	7.6	4.0	1.6

【0040】試験例1

本発明の有効成分であるラフィノースについて、ラットを用いて急性経口毒性試験を行った。

【0041】（1）試験方法

4週齢のウィスター系ラット（日本エスエルシー社から購入）雌雄各5匹を、通常のラット用固形飼料で1週間予備飼育を行い、健康に異常がないことを確認し、のち約13時間絶食させて体重を測定した。各ラットに、ラフィノース粉末（日本甜菜製糖社製）を精製水と混合し、400mg/mlとした溶液を、体重kg当たり6,000mgの割合で胃ゾンデを用いて強制単回投与した後、投与日は頻回観察を行い、更に13日間1日1回の観察を行った。また、投与後1週ごとに体重を測定し、観察終了時には全てのラットを解剖し、異常の有無を肉眼により観察した。

【0042】（2）試験結果

試験に用いた全てのラットとも、観察期間中に死亡例は認められず、臨床的にも全てのラットにおいて異常は認められなかった。

【0043】投与後1週及び2週後の体重測定の結果を表2に示したが、雌雄ともに体重増加抑制は認められなかった。また、観察終了後の剖検においても、全てのラットともに主要臓器に異常は認められなかった。

【0044】従って、本発明の有効成分であるラフィノースの、ラットにおける単回経口投与における致死量は、雌雄ともに6,000mg/kg以上であることが判明した。

【0045】

【表2】

ラットNo.	投与前	投与後	
		7日	14日
オス 1	106.1	152.2	194.1
2	102.1	146.0	188.3
3	109.1	163.4	203.0
4	109.1	162.4	204.2
5	108.1	160.3	202.4
オス 平均±標準偏差	106.9±2.9	156.9±7.5	198.4±6.9
メス 1	84.5	112.0	126.4
2	87.3	120.6	138.9
3	87.8	120.5	138.6
4	89.2	122.8	142.6
5	83.2	112.2	129.4
メス 平均±標準偏差	86.4±2.5	111.6±5.1	135.2±6.9

20 【0046】試験例2

本発明の有効成分であるラフィノースの突然変異誘起性について、Escherichia coli WP2 uvrA 株、並びに、Salmonella typhimurium TA 系4株を用いて、代謝活性化法を含む復帰変異試験（エームス試験）を行った。

【0047】（1）試験方法

1）供試菌株

Escherichia coli WP2 uvrA 株、Salmonella typhimurium TA100、TA1535、TA98及びTA1537の5菌株を用いた。

【0048】試験に際しては、Nutrient broth No.2

（OXOID社製）10mlを分注したL字型試験管に、-80℃で凍結保存した各菌株を接種し、37℃で約7時間振とう培養し、得られた菌懸濁液を試験に用いた。

【0049】2）試験液の調製

ラフィノース（日本甜菜製糖社製）を精秤し、高圧蒸気滅菌（121℃、20分間）した純水（以下「滅菌水」と記載する。）を添加し、試験管ミキサーによる攪拌を行い、50mg/mlの溶液を調製した。これを試験原液として、滅菌水を用いて適宜希釈し、試験に供した。

【0050】3）試験濃度

ラフィノースの濃度は、最高濃度を5,000μg/平板とし、2,500、1,250、625、313及び156μg/平板の6段階で試験を実施した。

【0051】4）試験操作の方法

ブレインキューベーション法（代謝活性化法によらない場合及び代謝活性化法による場合の両条件）により次のとおり試験を行った。

【0052】所定の濃度に調製した試験液0.1mlを滅菌した小試験管に秤取し、次の組成のS9 Mix又は

0.1M Na-リン酸緩衝液（pH7.4）0.5ml

及び各菌懸濁液0.1mlを順次添加した。各小試験管を37℃の恒温槽中で20分間振とう（ブレインキューベーション）し、のち次のトップアガー2mlを添加して混合し、最少グルコース寒天平板培地（日清製粉社製。直径100mm、3.0ml）シャーレ上に均一に広げて固化させた。このシャーレを37℃の恒温器中で48時間培養し、復帰突然変異により生じたコロニー数を計数した。尚、試験液、及びS9 Mixは雑菌の混入のない*

[S9 Mixの組成]

S9（キッコーマン社製）	0.1ml（/ml）
MgCl ₂	8μmol
KCl	33μmol
グルコース-6-リン酸	5μmol
NADPH	4μmol
NADH	4μmol
Na-リン酸緩衝液（pH7.4）	100μmol

【トップアガー】Bacto agar（DIFCO社製）0.6%及びNaCl 0.5%からなる培地を高圧蒸気滅菌後、S. typhimurium TA系4株については、別に滅菌した0.5mMヒスチジン-ビオチン溶液を1/10倍量、E. coli WP2 uvrA株については、0.5mMトリプトファン溶液を1/10倍量添加して混合した。

【0055】（2）試験結果

代謝活性化法によらない場合（S9 Mix非存在）の結果は表3に、代謝活性化法による場合（S9 Mix存在）の結果は表4に、それぞれ示すとおりである。 ※

*ことを確認した。

【0053】また、AF-2 [2-(2-furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide]、ENNG [N-ethyl-N'-nitro-N-nitrosoquandine]、9-AA [9-aminoacridine]（以上、S9 Mix非存在）、2-AA [2-aminoacridine]（S9 Mix存在）、を用いて陽性対照試験を行った。

【0054】

※【0056】いずれの場合においても、陽性対照として用いた化合物では、溶媒対照と比較して顕著な復帰変異コロニー数の増加が認められたが、ラフィノースについては、6段階の全ての濃度において、溶媒対照と比較して復帰変異コロニー数の増加は認められなかった。

【0057】以上の結果から、本試験条件下において本発明の有効成分であるラフィノースの突然変異誘起性は陰性であることが明らかである。

【0058】

【表3】

ラフィノース濃度 (μg/平板)		復 帰 変 異 コ ロ ニ ー 数 (平板)				
		塩 基 対 置 換 型			フ レ ー ム シ フ ト 型	
		TA100	TA1535	WP2uvrA	TA98	TA1537
0		101 87	5 3	22 31	12 15	7 5
156		100 90	5 3	17 24	19 16	14 9
313		118 108	5 7	14 18	9 16	8 9
625		98 81	5 7	23 20	20 17	6 5
1250		83 83	3 7	25 14	24 24	7 5
2500		91 85	3 4	26 18	15 14	6 10
5000		83 80	7 2	22 18	11 11	10 5
陽性対照	名 称	AF-2	ENNG	AF-2	AF-2	9-AA
	濃度 μg/平板	0.01	5	0.01	0.05	80
	コロニー数/平板	508 609	6180 6424	337 331	347 354	3052 3116

【0059】

【表4】

ラフィノース濃度 ($\mu\text{g}/\text{平板}$)	復帰変異コロニー数(ノ平板)				
	塩基対置換型			フレームシフト型	
	TA100	TA1535	WP2uvrA	TA98	TA1537
0	101 95	6 9	26 22	20 28	12 18
156	77 86	7 7	27 25	26 27	18 14
313	103 91	6 7	27 18	23 22	17 19
625	110 108	12 5	25 25	27 17	21 16
1250	117 107	5 4	20 26	25 30	21 12
2500	99 96	10 4	29 21	21 21	16 21
5000	91 106	8 10	39 26	23 33	12 16
陽性対照	名 称	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA
	濃度 $\mu\text{g}/\text{平板}$	1	2	10	0.5
	コロニー数/平板	765 677	168 157	238 274	143 136

試験例3

この試験は、本発明の肝疾患治療剤の有効投与量を検討するために行った。

【0060】(1) 試験方法

7～9週齢の39匹のSD系雄ラットを、1週間予備飼育して飼育環境に馴化させ、健康状態に問題のないことを確認して試験に供した。尚、予備飼育、試験期間中は、水道水、及び市販の固形飼料を自由摂取させた。

【0061】39匹を無作為に1群18匹ずつ2群(A群及びB群)及び対照群3匹に分け、A群及びB群のラットは、更に無作為に3匹ずつ6群に分けた。

【0062】A群のラットには、実施例1に記載した肝疾患治療剤を、ラフィノースとして1日体重1kg当たり0.5、1.0、1.5、2.0、3.0及び6.0gを、1日2回等量に分けて7日間反復経口投与した。

【0063】一方、B群のラットには、ラクチュロースシロップ(森永乳業社製。ラクチュロース含量50%)を、ラクチュロース量として1日体重1kg当たり0.5、1.0、1.5、2.0、3.0及び6.0gを、1日2回等量に分けて7日間反復経口投与した。

【0064】対照群は、無処置のまま7日間予備飼育と同一環境下に飼育を係属した。7日目の最終投与終了から数時間後に、全てのラットから麻酔下で門脈血を採取し、遠心分離により血漿を分離した後、門脈血中のアンモニア濃度を測定キット(和光純薬工業社製)を用いて測定した。

【0065】(2) 試験結果

この試験結果を表5に、それぞれ各群3匹の平均値で示

した。表5から、A群ではラフィノースの投与量0.5及び1.0g/kg/日では、対照群と比較して門脈血中のアンモニア濃度に有意な変化は認められなかったが、1.5g/kg/日以上での投与量では、用量に依存してアンモニア濃度が低下した。一方、B群では、1.5g/kg/日以下の投与量では効果が認められず、2.0g/kg/日以上での投与量で、用量に依存してアンモニア濃度が低下した。尚、A群、B群とも、試験した最大投与量6.0g/kg/日の投与群においても、糞便の軟便化、摂餌量の低下等の副作用は何ら認められなかった。

【0066】以上の結果から、ラフィノースを有効成分として含有する製剤が、体内に吸収されるアンモニア量を顕著に減少させ、肝疾患患者の高アンモニア血症の改善に有用であることが明らかである。また、ラフィノースの有効投与量としては、ラクチュロース投与量の約3/4倍で同等の効果を示しているため、ラクチュロースの臨床使用量が20～60g[65%シロップとして、30～90ml(胆肝脾、第26巻、第2号、第297～303ページ、1993年)]であることから、標準体重50kgとしてラフィノースの有効投与量は、1日体重kg当たり0.3～0.9gと算出される。

【0067】尚、ラフィノースの種類を変更して試験して有効投与量を算出したが、ほぼ同様の結果が得られた。

【0068】

【表5】

13 門脈血中アンモニア濃度 ($\mu\text{g}/\text{dl}$)	14 投与量 ($\text{g}/\text{kg}/\text{日}$)						
	0	0.5	1.0	1.5	2.0	3.0	6.0
A (ラフィノース) 群	402	395	375	312	276	250	232
B (ラフィノース) 群	402	408	391	368	310	269	240

【0069】試験例2

この試験は、本発明の肝疾患治療剤の、慢性肝不全モデル動物に対する高アンモニア血症改善効果を検討するために行った。

【0070】(1) 試験方法

9週齢の12匹のSD系雄ラットを、1週間予備飼育して飼育環境に馴化させ、健康状態に問題のないことを確認した後、門脈下大静脈吻合手術 (PCS形成手術) を行い慢性肝不全モデルラットとした。尚、予備飼育、試験期間中は、水道水、及び市販の固形飼料を自由摂取させた。

【0071】術後7日目に、12匹を無作為に1群3匹ずつ4群に分け、実施例1に記載した肝疾患治療剤を、ラフィノースとして1日体重1kg当たり0 (対照群)、2.0、3.0及び4.0gを、1日2回等量に分けて7日間反復経口投与した。

【0072】7日目の最終投与終了から数時間後に、全てのラットから麻酔下で腹部大静脈より血液を採取し、遠心分離により血漿を分離した後、血中のアンモニア濃度を測定キット (和光純薬工業社製) を用いて測定し、各群の平均値を算出して試験した。

【0073】(2) 試験結果

この試験の結果、静脈血のアンモニア濃度 ($\mu\text{g}/\text{dl}$) は、対照群の平均が162であるのに対して、2.0g/kg/日投与群の平均が132、3.0g/kg/日投与群の平均が122、4.0g/kg/日投与群の平均が118であった。従って、慢性肝不全モデルラットにおいて、ラフィノースとして2.0~4.0g/kg/日の用量で本発明の肝疾患治療剤を投与することにより、血中のアンモニア濃度が顕著に低下し、本発明の肝疾患治療剤が、慢性肝不全患者に発生する高アンモニア血症の改善に有用であることが明らかである。

【0074】尚、実施例1記載の肝疾患治療剤に代えて、実施例2記載の肝疾患治療剤を用いて同様の試験を行ったが、ほぼ同様の効果が確認された。更に、ヒトにおける予備臨床試験においても、同様の効果が確認されている。

【0075】

【実施例】次に、実施例を示して本発明を更に詳細に説明するが、本発明は以下の実施例に限定されるものではない。

10 【0076】実施例1

ラフィノース (日本甜菜製糖社製) 20kg及び精製水 (イオン交換水) 80kgを混合し、滅菌し、のち200gずつ滅菌したポリエチレン製容器に分注し、シロップ状の肝疾患治療剤490個を得た。

【0077】実施例2

ラフィノース (日本甜菜製糖社製) 16kg、及びラクチュロース・シロップ (森永乳業社製。ラクチュロース含量50%) 32kg及び精製水 (イオン交換水) 52kgを混合し、滅菌し、200gずつ滅菌したポリエチレン製容器に分注し、シロップ状の肝疾患治療剤490個を得た。

【0078】実施例3

ラフィノース (日本甜菜製糖社製) 40kg及び賦形剤としてデキストリン60kgを均一に混合し、20gずつアルミ箔製の袋に充填し、密封し、粉末状の肝疾患治療剤4,800個を得た。

【0079】

【発明の効果】以上詳記したとおり、本発明は、ラフィノースを有効成分として含有する肝疾患治療剤に関するものであり、本発明により奏せられる効果は、次のとおりである。

1) 本発明の肝疾患治療剤は、肝疾患患者の腸内環境を早期にかつ効果的に改善することにより、肝臓機能の負担の軽減化を図ることができる。

2) 本発明の肝疾患治療剤は、ビフィズス菌を増殖させアンモニア産生菌を抑制することにより、腸管内でのアンモニア等毒性物質の発生、並びに、腸管から体内への毒性物質の吸収を抑制し、肝性脳症、高アンモニア血症の予防、及び治療に有効である。

3) 本発明の肝疾患治療剤は、下痢、軟便、腹部膨満感等の副作用の心配が少ない。

4) 本発明の肝疾患治療剤は、甘味が少なく、飲用、摂取しやすい製剤である。

フロントページの続き

(72)発明者 大橋 俊夫
神奈川県座間市東原5-1-83 森永乳業
株式会社栄養科学研究所内

(72)発明者 川瀬 興三
神奈川県座間市東原5-1-83 森永乳業
株式会社栄養科学研究所内

(72)発明者 中村 浩彦
神奈川県座間市東原5-1-83 森永乳業
株式会社栄養科学研究所内

(72)発明者 佐山 晃司
北海道帯広市稲田町南九線西十三番地 日
本甜菜製糖株式会社総合研究所内